

# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

## Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie životního prostředí



Kateřina Horová

## SEPARACE DERIVÁTŮ CHLORFENOXYPROPIONOVÉ KYSELINY METODOU HPLC

HPLC separation of chlorophenoxypropionic acid derivatives

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Praha 2016

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

Podpis:

# Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na separaci chlorfenoxypropionové kyseliny a jejích derivátů pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pro separaci byl použit reverzní mód. Tyto sloučeniny jsou používány jako látky s herbicidní účinností, tedy látky hubící plevel. Herbicidy studované v této práci byly 2-(4-chlor-2-methylfenoxy)propionová kyselina, 2-(2,4-dichlorfenoxy)propionová kyselina, 2-(2-chlorfenoxy)propionová kyselina, 2-(3-chlorfenoxy)propionová kyselina a 2-(4-chlorfenoxy)propionová kyselina. Cílem této práce bylo nalézt a optimalizovat chromatografické podmínky pro simultánní separaci všech pěti herbicidů.

Pro analýzu byly použity dva druhy kolon a to kolona ZORBAX SB-C8 a kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18, které se liší svou polaritou. Jako mobilní fáze byly použity acetonitril/voda, acetonitril/kyselina mravenčí, pH 2,1 a methanol/kyselina mravenčí, pH 2,1.

Nejvhodnější separační podmínky byly: kolona ZORBAX SB-C8, mobilní fáze methanol/kyselina mravenčí (o koncentraci 0,365 mol/l, pH 2,1) 40/60 (v/v), teplota 25°C, průtok mobilní fáze 1 ml/min. Za těchto isokratických podmínek byly všechny herbicidy separovány až na základní linii během 80 minut.

## **Klíčová slova:**

HPLC, separace, herbicidy, deriváty chlorfenoxypropionové kyseliny

# Abstract

This Bachelor's thesis focuses on the separation of chlorophenoxypropionic acids and their derivatives by a high-performance liquid chromatography. The separations were performed in a reversed phase mode. These compounds are employed as herbicides, i.e. chemical substances to control unwanted plants, to kill weeds. The herbicides studied for the purposes of this thesis were 2-(4-chloro-2-methylphenoxy)propionic acid, 2-(2,4-dichlorophenoxy)propionic acid, 2-(2-chlorophenoxy)propionic acid, 2-(3-chlorophenoxy)propionic acid and 2-(4-chlorophenoxy)propionic acid. The study aimed at finding and optimizing chromatographic conditions for simultaneous separation of all five herbicides mentioned above.

The analysis employed two types of columns, that is ZORBAX SB-C8 column and ZORBAX Eclipse XDB-C18 column whose level of polarity differ. As mobile phases, there were used acetonitrile/water, acetonitrile/formic acid, pH 2.1 and methanol/formic acid, pH 2.1 in various volume ratios.

ZORBAX SB-C8 column, mobile phase methanol/formic acid (concentration of 0.365 mol/l, pH 2.1) 40/60 (v/v), temperature of 25°C, and flow rate of 1 ml/min delivered the most convenient separation conditions. Given these isocratic conditions, all the herbicides were baseline separated within 80 minutes.

## Keywords:

HPLC, separation, herbicides. derivatives of chlorophenoxypropionic acid

**Poděkování:**

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce RNDr. Květě Kalíkové, PhD., bez jejíhož vedení bych tuto bakalářskou práci nemohla vykonat a za její pomoc při laboratorním měření i při opravách na této práci. Také bych chtěla poděkovat za konzultace paní prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc., která mi pomohla najít směr, kterým bych se při psaní práce měla ubírat.

# OBSAH

Seznam použitých zkratk a symbolů .....	6
1. Úvod .....	7
2. Teoretická část .....	8
2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	8
2.2 Reverzní mód HPLC .....	9
2.3 Herbicidy .....	9
2.3.1 Rozdělení herbicidů .....	10
2.3.2 Negativní dopad herbicidů na životní prostředí .....	11
2.3.3 Růstové herbicidy .....	11
2.4 Fenoxalkanové kyseliny .....	11
2.4.1 Chlorfenoxalkanové kyseliny .....	12
2.4.2 Metody stanovení chlorfenoxypionových kyselin .....	13
2.4.3 Mekoprop a dichlorprop .....	14
2.4.3.1 Mekoprop .....	14
2.4.3.2 Dichlorprop .....	15
3. Cíl práce .....	16
4. Experimentální část .....	17
4.1 Použité přístroje .....	17
4.2 Použité kolony .....	17
4.3 Použité standardy herbicidů a chemikálie .....	17
4.4 Příprava vzorků .....	18
4.5 Podmínky separace .....	18
4.6 Mobilní fáze .....	19
4.3.5 Použité vzorce pro výpočty .....	19
5. Výsledky a diskuze .....	21
5.1 Spektrofotometrická analýza .....	21
5.2 HPLC analýza .....	22
5.2.1 Analýza na koloně ZORBAX SB-C8 .....	22
5.2.1.1 Analýza v MF ACN/voda .....	22
5.2.1.2 Analýza v MF ACN/kyselina mravenčí .....	23
5.2.1.3 Analýza v MF MeOH/kyselina mravenčí .....	27
5.2.2 Analýza na koloně ZORBAX Eclipse XDB-C18 .....	29
5.2.2.1 Analýza v MF ACN/kyselina mravenčí .....	29
5.2.2.2 Analýza v MF MeOH/kyselina mravenčí .....	32
6. Závěr .....	35
7. Seznam použité literatury .....	36

# Seznam použitých zkratek a symbolů

2-CPPA – 2-(2-chlorfenoxy)propionová kyselina

2,4-D – 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina

2,4,5-T – 2,4,5-trichlorfenoxyoctová kyselina

3-CPPA – 2-(3-chlorfenoxy)propionová kyselina

4-CPPA – 2-(4-chlorfenoxy)propionová kyselina

$c_m$  – koncentrace analytu v mobilní fázi

$c_s$  – koncentrace analytu ve stacionární fázi

DCPP – dichlorprop-P

GC – plynová chromatografie

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IARC – International Agency for Research on Cancer

$k$  – retenční faktor

$K_D$  – distribuční koeficient

LC – kapalinová chromatografie

MCPA – (4-chlor-2-methylfenoxy)octová kyselina

MCPB – 4-(4-chlor-2-methylfenoxy)máselná kyselina

MCPP – mekoprop-P

MeOH – methanol

MF – mobilní fáze

MNA – Monitored Natural Attenuation

MS – hmotnostní spektrometrie

NP – normální mód

PDA – detektor s diodovým polem

RP – reverzní mód

$t_M$  – mrtvý čas kolony

$t_R$  – retenční čas analytu

SF – stacionární fáze

$w$  – šířka píku v polovině výšky

$\alpha$  – selektivita

# 1. Úvod

Životní prostředí je pro člověka důležité, a proto by se měl zabývat jeho ochranou a minimalizováním poškozujících a znečišťujících dopadů na jeho jednotlivé složky. Je to prostředí, které nás obklopuje a ve kterém žijeme, stejně tak jako ostatní organismy a živočichové. Z toho důvodu musíme dbát na bezpečnost látek, které do něj vpouštíme a zabývat se jejich monitoringem i studii o jejich přeměnách a potenciálních škodách.

Ohroženými složkami jsou voda, půda i vzduch, do kterých se dostávají všechny chemické látky, které v běžném životě používáme či je produkuje průmyslově. Tyto složky jsou námi dosti zatěžovány a je nutné je neustále sledovat a analyzovat. To platí také pro chemické látky, které používáme v ekosystémech. U těchto látek bychom se měli co nejvíce vyvarovat potenciálním toxickým a zničujícím dopadům vytvářením nových a šetrnějších technologií, a nebo náhradou daných chemických látek za jiné látky s podobným či stejným účinkem, které mají minimální a nebo nízké negativní dopady.

Chlorfenoxypionová kyselina a její deriváty se řadí mezi látky s herbicidní účinností. Herbicidy jsou látky, které zatěžují hlavně složky vody a půdy, a proto je třeba je dále zkoumat. Musíme se snažit vytvořit účinnou metodu, při které se dají od sebe oddělit ke kvalitativnímu či kvantitativnímu určení v daných maticích či vzorcích odebraných ze životního prostředí. Tyto chemické látky hubící plevel se snadno dostávají do životního prostředí, kde se mohou roznášet do okolí a případně přeměňovat různými reakcemi či mikrobiální činností.

V okolí míst, na které byly tyto látky aplikovány, by se měly odebírat vzorky k dalším laboratorním analýzám. Tyto analýzy nám poskytnou hledané informace o jejich rozšíření a době zadržení v daném ekosystému za daných podmínek. Právě metoda HPLC použitá v této bakalářské práci, je vhodná pro kvalitativní i kvantitativní analýzu těchto látek.



## 2. Teoretická část

### 2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) se řadí mezi separační metody. Tato metoda je založená na dělení látek směsi mezi mobilní (pohyblivou) fází, což je v tomto případě kapalina, a mezi stacionární (nepohyblivou) fází, což může být buď jiná nemísitelná kapalina ukotvená na nosiči a nebo pevná látka. Při přiblížení se rovnovážnému stavu lze rozdělení látek mezi tyto fáze popsat distribučním koeficientem  $K_D$ .

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

(1)

kde :  $c_s$  = koncentrace analytu ve stacionární fázi,  $c_m$  = koncentrace analytu v mobilní fázi.

Na základě rozdílné velikosti  $K_D$  jsou některé analyty na stacionární fázi zadržovány méně a některé více. Separované analyty jsou následně zaznamenány ve formě chromatografických píků (elučních křivek).

Systémy v kapalinové chromatografii lze rozdělit například dle typu stacionární a mobilní fáze na normální mód HPLC (NP HPLC) a reverzní mód HPLC (RP HPLC), kdy je u NP polárnější stacionární fáze a u RP je polárnější mobilní fáze. Dále se dělí také na hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii (HILIC), iontově-výměnnou chromatografii, atd<sup>1</sup>.

V HPLC lze využít k eluci analytů buď isokratickou nebo gradientovou eluci. Isokratická eluce je založena na použití mobilní fáze o neměnném složení a tudíž i o stejné eluční síle. Gradientová eluce využívá většinou lineární změnu složení mobilní fáze (MF). Složení MF se mění od složení s nižší eluční silou k MF s vyšší eluční silou.

Existuje řada typů stacionárních fází (SF) pro HPLC. SF jsou charakterizovány např. velikostí a tvarem částic, objemem, velikostí pórů nebo specifickým povrchem. SF můžeme rozdělit dle typu fáze na kapalné a nebo tuhé. Tyto fáze vykazují různé vlastnosti. Podle typu sorbentu je můžeme rozdělit na polární, nepolární, iontové, gelové, zwiteriontové, apod.

Přístroj, který využívá metodu HPLC se nazývá kapalinový chromatograf. Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníku nebo více zásobníků mobilní fáze. U systémů s více zásobníky přechází složky MF do směšovače pomocí vysokotlakých čerpadel, která mohou

být různého typu u různých kapalinových chromatografů. Dále jsou v systému velmi často zapojeny odplyňovače mobilní fáze. Do těchto systémů je možno dávkovat vzorek buď ručně (manuální dávkovací ventil) a nebo automatickým dávkovačem (autosampler). Vzorek se po nadávkování dostává do chromatografické kolony, která je velmi často umístěna v kolonovém termostatu a následně jsou odezvy vzorku změřeny detektorem. V HPLC se využívají různé druhy detektorů. Detektory se nejčastěji dělí na detektory koncentrační a hmotnostní. Mezi koncentrační se řadí např. spektrofotometrický detektor<sup>2</sup>.

## 2.2 Reverzní mód HPLC

Reverzní mód HPLC je tvořen mobilní fází, která je obecně polárnější než fáze stacionární.

RP HPLC je využívána pro dělení analytů o různé polaritě. Analyzovat se mohou různé typy makromolekulárních látek, biopolymerů, nepolárních uhlovodíků, apod. U nepolárních látek je rozdělení založeno hlavně na interakcích mezi analytem a stacionární fází kvůli působení disperzních interakcí. Při zvýšení eluční síly rozpouštědla se dají snížit retenční časy eluovaných analytů<sup>3</sup>.

Jako stacionární fáze se nejčastěji používají chemicky vázané fáze, které mohou využívat široký rozsah polarity analytů. Nejvyužívanější SF pro RP HPLC jsou silikagelové fáze. Na silikagelový nosič se připojují různé funkční skupiny, a to například alkyly, fenyly, amino- a kyano- skupiny<sup>4</sup>. Mohou se také používat organické polymery, jako jsou polystyreny, polyakrylamidy, apod.

Jako mobilní fáze se nejčastěji používají vodné roztoky organických rozpouštědel, u kterých se při separování iontových sloučenin přidávají do mobilní fáze navíc soli kyselin či bazí, a nebo se přidávají neutrální sole či pufrů<sup>5</sup>. Rozpouštědla, která se nejčastěji používají jsou methanol, acetonitril, tetrahydrofuran a 2-propanol. Většinou se aplikují ve směsích s vodnou fází o různých objemových poměrech (např. MeOH/voda 50/50 (v/v)). Méně často se používá nevodného prostředí, kdy mobilní fází je pouze čisté rozpouštědlo. Rozpouštědla se mohou kombinovat ve dvojitých či trojitých směsích<sup>6</sup>.

## 2.3 Herbicidy

V zemědělství se využívá mnoha látek vhodných pro ochranu rostlin před poškozením různými škůdci. Tyto látky se nazývají pesticidy. Pesticidy lze rozdělit na fungicidy, insekticidy a herbicidy. Herbicidy jsou látky, které se užívají k hubení plevelů<sup>7</sup>.

Nejčastější aplikace jsou převážně postřikové jichy, které se tvoří přímo před použitím na plodiny z emulgovaných či suspenzních koncentrátů, smáčitelných prášků a mikrogranulí<sup>8</sup>. Další aplikace mohou být granule a nebo u systémových herbicidů nátěrové pasty<sup>9</sup>.

Podle monitorování MNA (Monitored Natural Attenuation) je snaha vytvořit nástroje pro jejich odstraňování, jako je například vyčerpání akceptorů elektronů, generace vedlejších produktů či tvorba degradačních produktů přímo na polích. Použití těchto nástrojů by pak záviselo na skutečných formách daných herbicidů<sup>10</sup>.

### 2.3.1 Rozdělení herbicidů

Herbicidy lze dělit do různých kategorií několika způsoby. Nejčastější rozdělení jsou:

#### 1. Dle chemického hlediska daných účinných látek:

A. *Herbicidy anorganické* – tvořené anorganickými sloučeninami, jako jsou např. zelená skalice, síran amonný, chlorečnan vápenatý, atd.

B. *Herbicidy organické* – tvořené organickými látkami a jejich deriváty, jako jsou např. deriváty fenolů, močoviny, kyseliny benzoové, fenoxymáselné či fenoxysalkanové, diazinů, apod<sup>11</sup>.

#### 2. Dle selektivity herbicidních látek:

A. *Selektivní herbicidy* - hubí pouze určité plevely a jsou založeny na různých pochodech, které se v nich uskutečňují. Jsou proto výhodné pro přímou aplikaci na danou rostlinu a navíc nepoškozují kulturní plodiny.

B. *Neselektivní herbicidy* - ničí veškerou vegetaci, což je vhodné například při odstraňování rostlin podél silnic a cest<sup>12</sup>.

#### 3. Dle způsobu účinku herbicidní látky:

A. *Kontaktní (dotykové) herbicidy* - poškozují jen místa, na kterých byly aplikovány, což bývají pletiva daných plevelů. Jsou vhodné na jednoleté plevely, u víceletých je možnost regenerace plevelu z kořenových částí.

B. *Systémové herbicidy* - jsou rostlinou rozváděny (translokace xylémem i floémem) a eliminují vše, i plevely vytrvalé.

C. *Sterilizující herbicidy* - mohou být buď krátkodobé a nebo trvalé. Jsou určeny k eliminaci všech rostlin na dané půdě<sup>13</sup>.

#### 4. Dle tříd plevelů, které eliminují:

A. *Herbicidey eliminující jednoděložné plevely.*

B. *Herbicidey eliminující dvouděložné plevely.*

C. *Herbicidey eliminující jednoděložné i dvouděložné plevely*<sup>14</sup>.

### **2.3.2 Negativní dopad herbicidů na životní prostředí**

Škodlivost herbicidních látek v životním prostředí je dána narušením vnitřních pochodů v půdě a mikrobiálních společenstev. Negativním dopadem je také nárůst plevelů odolných k daným herbicidům po vymizení těch eliminovaných, díky čemuž se na polích rozmnožují např. rdesna, ježatky kuří nohy či svízele přítuly. Proti tomu se dá bránit střídáním látek ošetřujících daná pole<sup>15</sup>. Nebezpečné je také používání perzistentních herbicidů, jejichž rezidua se mohou přenášet také do zpracovaných potravin a tím do potravního řetězce. Všechny herbicidní látky také zasahují do povrchových i podzemních toků, kde se mohou rozšiřovat. Rozšíření herbicidů může být také způsobeno erozí půdy, na které se herbicidey aplikují<sup>16</sup>. Jelikož jsou tyto přípravky „jedy“, jsou nebezpečné pro celou řadu organismů a při neopatrné aplikaci mimo návod použití i pro samotného člověka. Vysoké dávky herbicidů také mohou poškodit i samotné plodiny, na které je používáme, a snižovat tak jejich produkci<sup>17</sup>.

### **2.3.3 Růstové herbicidey**

Růstové herbicidey jsou synteticky vyráběné auxoidní látky. Tedy látky, které se v rostlinném těle účastní různých buněčných procesů a tím narušují jeho růst a metabolismus. Mezi tyto herbicidey patří deriváty karboxylových kyselin (např. kyseliny benzoové, fenoxykyseliny).

Jako derivát benzoové kyseliny působí 3,6-dichloro-2-methoxybenzoová kyselina (dicamba). Mezi herbicidní látky derivátů fenoxykyselin patří například 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D), (4-chlor-2-methylfenoxy)octová kyselina (MCPA), 4-(4-chlor-2-methylfenoxy)másečná kyselina (MCPB). Mezi další deriváty karboxylových kyselin patří například 3,6-dichloro-2-pyridinkarboxylová kyselina (clopyralid), 2-[(4-amino-3,5-dichlor-6-fluor-2-pyridyl)oxy]octová kyselina (fluroxypyr) či 4-amino-3,6-dichlorpyridin-2-karboxylová kyselina (aminopyralid)<sup>18</sup>.

## **2.4 Fenoxalykanové kyseliny**

Fenoxalykanové kyseliny mají vysokou aktivitu a selektivitu proti plevelům. Do

zemědělství byly uvedeny v roce 1940 jako regulátory růstu<sup>19</sup>. Tyto látky jsou dobře rozpustné ve vodě a z tohoto důvodu jsou potenciální hrozbou pro lidské zdraví a kontaminace ekosystémů, hlavně pitných vod a vodních toků<sup>20</sup>.

Fenoxyalkanové kyseliny působí jako systémové herbicidy. Jejich biologická aktivita je určována délkou uhlíkového řetězce a povahou samotné fenoxyalkanové kyseliny<sup>21</sup>. Často se připravují směsi více látek s herbicidní účinností, jako jsou například dicotex (2,4-D a MCPA), diclotex RTU (2,4-D, MCPA, MCPP a dicamba), COM 503 01 H GR (2,4-D a dicamba) a OPTICA TRIO (MCPA, MCPP a DCPP)<sup>22</sup>.

Fenoxyalkanové kyseliny mohou být chirální. U většiny těchto fenoxyalkanových kyselin vykazujících chiralitu má herbicidní účinek pouze jeden z enantiomerů. Často se však užívají v racemické směsi bez oddělení, což způsobuje větší kontaminaci. Tímto způsobem se přenáší do životního prostředí o 50% více škodlivé látky, než v případě čistého enantiomeru s danou herbicidní účinností<sup>23</sup>. Například deriváty fenoxypropionových kyselin, kde herbicidně působí pouze *R*-enantiomery, jsou v zemědělství využívány právě jako racemické směsi<sup>24</sup>. Jsou to látky, jež aplikací eliminujeme širokolisté plevely a to nejčastěji při postemergentní aplikaci (doba po vzejití plevelů), což může mít za následek jejich přenesení do potravin i krmiv pro hospodářská zvířata<sup>25</sup>.

#### 2.4.1 Chlorfenoxyalkanové kyseliny

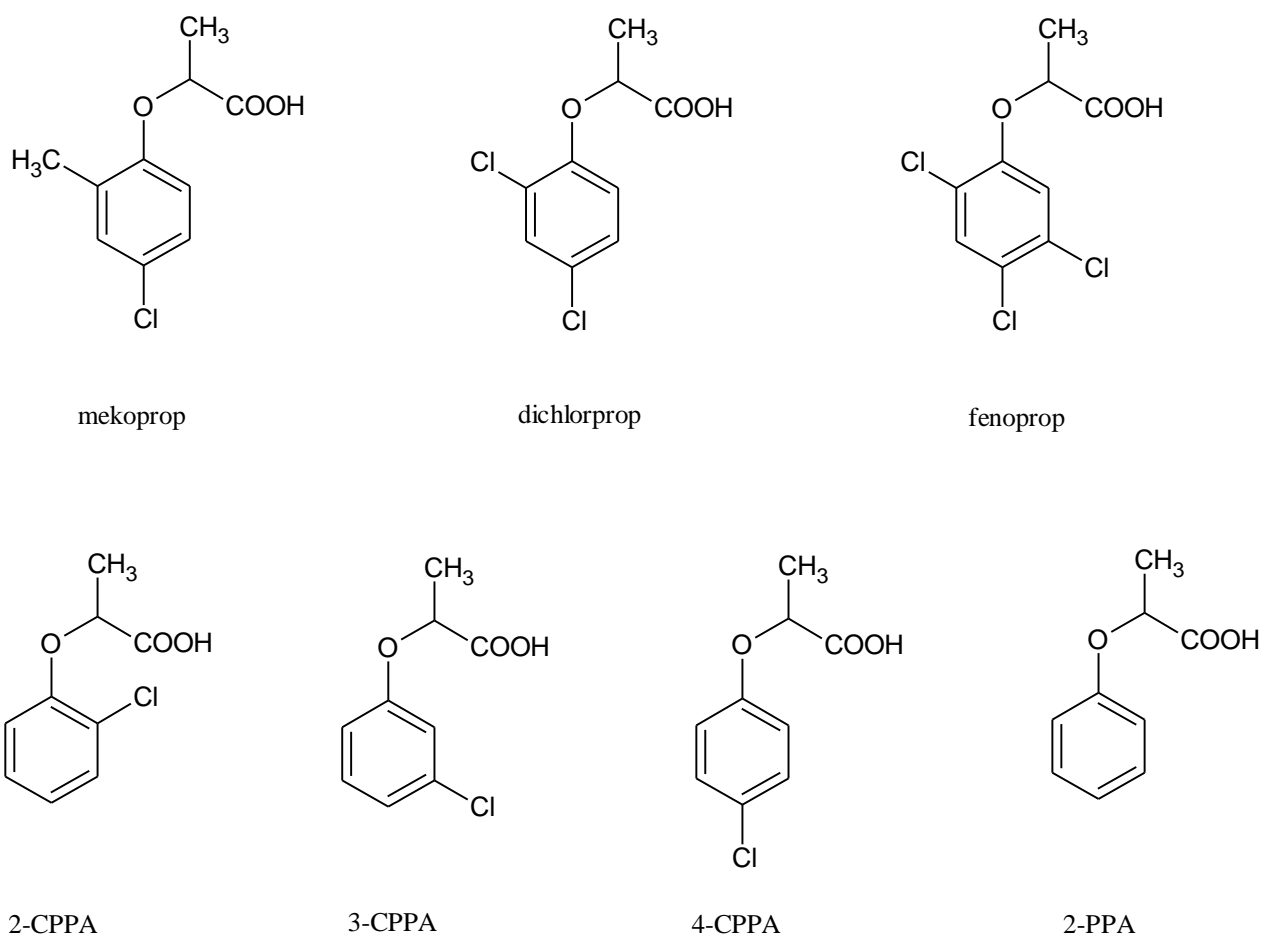
Chlorfenoxyalkanové kyseliny jsou podle IARC (International Agency for Research on Cancer) kategorizovány do skupiny 2B, což je skupina podezřelých karcinogenů pro člověka<sup>26</sup>.

V životním prostředí se mohou přeměňovat na jiné látky. Toxicita těchto látek může být také různá. Chlorfenoxyalkanové kyseliny mají biologický dopad na ekosystémy a mohou být hrozbou pro životní prostředí<sup>27</sup>. Nejrychleji degradují ve svrchních vrstvách půdy, kde je aerobní prostředí, které napomáhá jejich rozkladu. V podloží mohou stopy kyselin přetrvávat až několik let. Na rozkladu se také velmi podílejí mikroorganismy, které tyto látky přeměňují na jiné<sup>28</sup>.

Chlorfenoxyalkanové kyseliny jsou dobře rozpustné ve vodě a mohou být přeneseny do povrchových i podzemních vod, čímž mohou zvyšovat kontaminaci i poškození životního prostředí. Nejčastějšími produkty transformace chlorfenoxyalkanových herbicidů jsou 2,4-dichlorfenol, 4-chlor-2-methylfenol, 4-chlor-2-methyl-6-nitrofenol a 2,4-dichlor-6-nitrofenol. Nitrací, ke které může v půdách docházet, se transformační produkty kyselin mění na nitroderiváty, které mohou být pro lidskou populaci potenciálně karcinogenní či genotoxické.

To samé platí i pro chlorfenoly a další produkty štěpení<sup>29</sup>.

Mezi chlorfenoxyalkanové kyseliny využívané jako herbicidy se řadí převážně deriváty chlorfenoxypropionové kyseliny, což jsou 2-(4-chlor-2-methylfenoxy)propionová kyselina (mekoprop), 2-(2,4-dichlorfenoxy)propionová kyselina (dichlorprop), 2-(2,4,5-trichlorfenoxy)propionová kyselina (fenoprop), 2-(2-chlorfenoxy)propionová kyselina (2-CPPA), 2-(3-chlorfenoxy)propionová kyselina (3-CPPA), 2-(4-chlorfenoxy)propionová kyselina (4-CPPA) a 2-fenoxypropionová kyselina (2-PPA). Struktury těchto látek jsou znázorněny na Obr. 1.



Obr.1. Strukturní vzorce derivátů chlorfenoxypropionové kyseliny, využívaných jako herbicidní látky, nakreslené v programu ChemSketch<sup>30</sup>.

## 2.4.2 Metody stanovení chlorfenoxypropionových kyselin

Matrice, ve kterých se analyzují a stanovují fenoxalkanové kyseliny jsou většinou voda nebo půda. V životním prostředí se vyskytují v nízkých koncentracích, proto se většinou využívají prekoncentrační či derivatizační kroky před vlastním stanovením<sup>31</sup>. Metody těchto stanovení jsou uvedeny v tabulce Tab. 1.

Tab.1. Příklady metod pro separace a stanovení derivátů chlorfenoxypionové kyseliny.

Stanovení	Separační metoda	Detekce	Matrice	Mobilní fáze	Stacionární fáze
MCPP, DCP <sup>32</sup>	nano LC	PDA	půda	70% methanol, 30% kyselina fosforečná (0,05M, pH 2,5)	C-18
MCPA, MCPP, DCP <sup>33</sup>	GC	MS	voda	He	dimethylpolysiloxanová fáze
MCPA, MCPP, DCP <sup>34</sup>	GC	MS	vzduch	He	5% fenyl, 95% polydimethylsiloxan
DCP <sup>35</sup> , MCPP	HPLC	PDA, CD	voda	n-hexan + různé poměry isopropanolu nebo ethanolu	amylóza tris-(3,5-dimethylfenylkarbamát)
MCPP, DCP <sup>36</sup>	HPLC	PDA	čistírenské kaly z ČOV	70% methanol, 30% NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50 mM, pH 3)	permethylovaný α-cykloextrin
DCP <sup>37</sup> , MCPP	HPLC	UV-VIS	voda	70% methanol, 30% NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50 mM, pH 3)	permethylovaný α-cykloextrin
MCPP, DCP <sup>38</sup>	HPLC	PDA	půda	70% methanol, 30% kyselina fosforečná (0,05 M, pH 2,5)	C-18

## 2.4.3 Mekoprop a dichlorprop

Mezi nejčastěji používané chlorfenoxypionové kyseliny jako herbicidy se řadí mekoprop a dichlorprop.

Mekoprop a dichlorprop jsou látky, které snižují plodnost rostlin a negativně působí na vodní a půdní biotické systémy. V půdě se mohou jejich stopy vyskytovat až několik týdnů po aplikaci, kdy dochází k jejich rozšiřování do životního prostředí a případné kontaminaci pitné vody<sup>39</sup>. Jsou to herbicidní látky, které jsou v zemědělství využívány od roku 1960. Herbicidní účinek nesou jejich *R*-enantiomery. Zvýšením množství kyslíku při degradaci se urychluje jejich biologický rozklad<sup>40</sup>.

### 2.4.3.1 Mekoprop

MCPP je bílá až světle hnědá pevná látka, která je velmi dobře rozpustná ve vodě a proto se snadno dostává do vodních toků<sup>41</sup>. Mekoprop je vhodný pro odstranění plevelů u zemědělských plodin, jako jsou pšenice, oves, ječmen, apod<sup>42</sup>. Aplikuje se při začátku růstu plevelů na okrasné trávníky, sportoviště, farmy, apod. Eliminuje jednoleté i víceleté

šírokolisté plevelé. Jeho účinkem je zvýšení biosyntézy proteinů a produkce ethylenu, způsobuje abnormální růst buněk a poškozuje tak cévní tkáň daného plevelé<sup>43</sup>.

Mekoprop se v půdě přeměňuje na 4-chlor-2-methylfenol<sup>44</sup>. Dále se rozkládá také fotochemickými reakcemi, zejména na 4-chlor-*o*-kresol. Dalšími produkty přeměn jsou *o*-kresol, 2-methylcyklohexadi-2,5-en-1,4-dion, 2-methyl-1-methoxybenzen a 4-dihydroxybenzen<sup>45</sup>.

#### **2.4.3.2 Dichlorprop**

DCPP je pevná bílá látka. Ve vodě je dobře rozpustný a může se tak přenášet do vodních toků. Dichlorprop je vhodný pro eliminaci plevelů u zemědělských plodin, jako jsou kukuřice, pšenice, olivovníky, apod<sup>46</sup>. Aplikuje se při začátku růstu daných plevelů a může se používat na okrasné i rekreační trávníky, areály průmyslových objektů, apod. Eliminuje jednoleté i víceleté širokolisté plevelé, kdy způsobuje abnormální nárůst procesů v rostlině, jako je biosyntéza proteinů či produkce ethylenu. Také způsobuje nadměrné dělení buněk a tím poškozuje tkáň<sup>47</sup>.

Dichlorprop se v půdě rozkládá fotochemickými reakcemi, kdy se přeměňuje hlavně na 2,4-dichlorfenol. Dalšími produkty jsou 2-chlorfenol, 4-chlorfenol, 2,4-dichlorfenyl-acetát, 2-(4-chlor-2-hydroxyfenoxy) propanová kyselina a 2-(2-chlorfenoxy) propanová kyselina<sup>48</sup>.



### 3. Cíl práce

Cílem práce bylo nalezení vhodných podmínek pro separaci pěti herbicidů 2-(4-chlor-2-methylfenoxy)propionové kyseliny, 2-(2,4-dichlorfenoxy)propionové kyseliny, 2-(2-chlorfenoxy)propionové kyseliny, 2-(3-chlorfenoxy)propionové kyseliny a 2-(4-chlorfenoxy)propionové kyseliny v reverzním módu vysokoúčinné kapalinové chromatografie za isokratické eluce. Pro tento účel byly vybrány dvě stacionární fáze lišící se polaritou, tj. oktylsilikagelová a oktadecylsilikagelová fáze. Dílčím cílem této práce bylo porovnání jednotlivých separačních systémů z hlediska retence, selectivity a rozlišení.

## 4. Experimentální část

### 4.1 Použité přístroje

**Analytické váhy** : METTLER AE 240, Greifensee, Švýcarsko

**pH metr** : PHM240 pH/ION METER, MeterLab<sup>®</sup>, Radiometr analytical, SAS, Villeurbanne Cedex, Francie

**Kapalinový chromatograf** :

Alliance (Waters 2690D Separation Module), Waters, Milford, MA, USA

Detektor : Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector

Kolonový termostat : Waters

Software : Empower

**Spektrofotometr** :

Dvoupaprskový skenovací spektrofotometr SHIMADZU, Kyoto, Japonsko

Měřicí rozsah : 190 – 1100 nm

Zdroj záření : deuteriová lampa pro UV oblast, wolframová lampa pro viditelnou oblast

Temperování držáku kyvet : Peltierův článek s řídicí jednotkou TCC Controller

Program pro řízení přístroje a sběr dat : UV-Probe 2.21

**Software pro zpracování dat a tvorbu grafů**: Origin 6.1

### 4.2 Použité kolony

ZORBAX SB-C8, Agilent, Santa Clara, California, USA,  $4,6 \times 150$  mm, velikost částic 5  $\mu$ m

ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent, Santa Clara, California, USA,  $4,6 \times 150$  mm, velikost částic 5  $\mu$ m

### 4.3 Použité standardy herbicidů a chemikálie

**MCPP** : 2-(4-chlor-2-methylfenoxy)propionová kyselina, Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)

**DCPP** : 2-(2,4-dichlorfenoxy)propionová kyselina, Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)

**2-CPPA** : 2-(2-chlorfenoxy)propionová kyselina, Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)

**3-CPPA** : 2-(3-chlorfenoxy)propionová kyselina, Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)

**4-CPPA** : 2-(4-chlorfenoxy)propionová kyselina, Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)

**ACN** : Acetonitrile, CHROMASOLV<sup>®</sup>, gradient grade, for HPLC,  $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)

**Deionizovaná voda** : voda upravená pomocí zařízení Rowapur 100 a Ultrapur, WATREX, Praha, Česká republika

**Kyselina mravenčí** : Formic acid, gradient grade,  $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)

**MeOH** : Methanol, CHROMASOLV<sup>®</sup>, gradient grade, for HPLC,  $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)

## 4.4 Příprava vzorků

Zásobní roztoky vzorků herbicidů byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml MeOH. Ze zásobních roztoků byly následně připraveny roztoky ke spektrofotometrické analýze o koncentraci 0,01 mg/ml MeOH.

Pro HPLC měření byly ze zásobních roztoků vzorků herbicidů připraveny roztoky jednotlivých látek o koncentraci 0,2 mg/ml MeOH. Směs vzorků herbicidů obsahující MCPP, DCPP, 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA byla připravena v celkové koncentraci jednotlivých herbicidů 0,2 mg/ml MeOH. Směs tří vzorků herbicidů obsahující 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA byla také připravena o koncentraci jednotlivých herbicidů 0,2 mg/ml MeOH ze zásobních roztoků. Takto připravené vzorky byly dále analyzovány.

Roztok kyseliny mravenčí o koncentraci 0,365 mol/l a pH 2,1 byl připraven z destilované vody a 95% kyseliny mravenčí.

## 4.5 Podmínky separace

Separace vzorků herbicidů byla prováděna při termostatované koloně i vzorcích na 25°C. Průtok MF byl pro většinu analýz 1 ml/min. Pro analýzy směsi herbicidů na koloně ZORBAX SB-C8 s MF MeOH/kyselina mravenčí (o koncentraci 0,365 mol/l a pH 2,1) v poměrech 40/60 (v/v) a 35/65 (v/v) byl průtok nastaven na 1,5 ml/min. Dávkované množství vzorků herbicidů bylo 5  $\mu$ l. Mrtvý čas kolony byl určován pomocí MeOH. Při stanovení mrtvého času kolony při analýze na koloně ZORBAX SB-C8 s MF MeOH/kyselina mravenčí

(o koncentraci 0,365 mol/l a pH 2,1) byl zvýšen na dávkovaný objem 20 µl z důvodu nízké odezvy při nižším dávkovaném objemu. Vybrané vlnové délky měření byly pro herbicidní látky 224 nm a 278 nm, a pro MeOH 200 nm a 210 nm.

## 4.6 Mobilní fáze

První měření byla prováděna v MF obsahující směs ACN/voda o různých objemových poměrech. Při dalších analýzách byla využita směs ACN/kyselina mravenčí (o koncentraci 0,365 mol/l a pH 2,1). Následně byly analýzy prováděny v MF MeOH/kyselina mravenčí (o koncentraci 0,365 mol/l a pH 2,1) o různých objemových poměrech.

Na koloně ZORBAX SB-C8 byly separovány herbicidy v MF ACN/voda v poměrech 60/40 (v/v), 50/50 (v/v), 40/60 (v/v), 30/70 (v/v), 20/80 (v/v), 10/90 (v/v) a 5/95 (v/v). V MF ACN/kyselina mravenčí (o koncentraci 0,365 mol/l a pH 2,1) v poměrech 50/50 (v/v), 40/60 (v/v), 30/70 (v/v) a 20/80 (v/v). A v MF MeOH/kyselina mravenčí (o koncentraci 0,365 mol/l a pH 2,1) v poměrech 40/60 (v/v) a 35/65 (v/v).

Na koloně ZORBAX Eclipse XDB-C18 byly herbicidy analyzovány v MF ACN/kyselina mravenčí (o koncentraci 0,365 mol/l a pH 2,1) v poměrech 50/50 (v/v), 40/60 (v/v), 30/70 (v/v) a 20/80 (v/v). A v MF MeOH/kyselina mravenčí (o koncentraci 0,365 mol/l a pH 2,1) v poměrech 40/60 (v/v) a 35/65 (v/v).

### 4.3.5 Použité vzorce pro výpočty

*Retenční faktor:*

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

(2)

kde:  $k$  je retenční faktor,  $t_R$  je retenční čas analytu a  $t_M$  je mrtvý čas.

*Rozlišení:*

$$R = \frac{1.18(t_{R1} - t_{R2})}{w_1 + w_2}$$

(3)

kde:  $R$  je rozlišení,  $t_{R1}$  a  $t_{R2}$  jsou retenční časy 1. a 2. eluujícího analytu,  $w_1$  a  $w_2$  jsou šířky píků 1 a 2 v polovině jejich výšky.

*Selektivita:*

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

(4)

kde:  $\alpha$  je selektivita,  $k_1$  a  $k_2$  jsou retenční faktory 1. a 2. eluujícího analytu.

## 5. Výsledky a diskuze

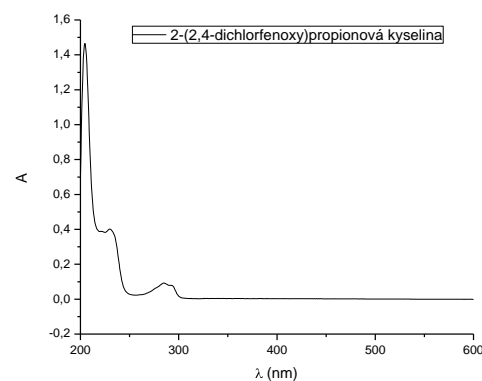
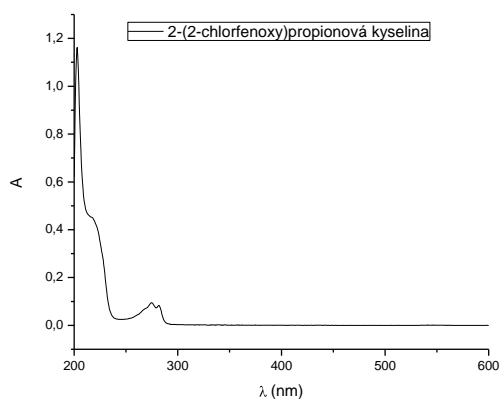
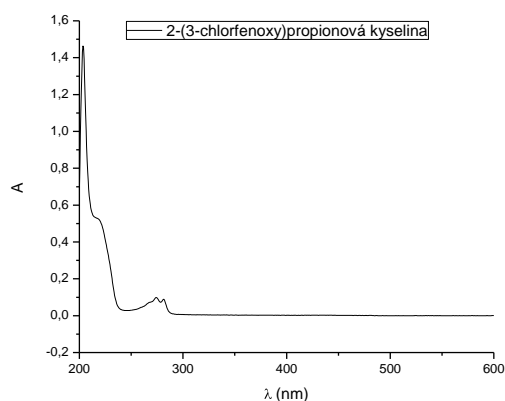
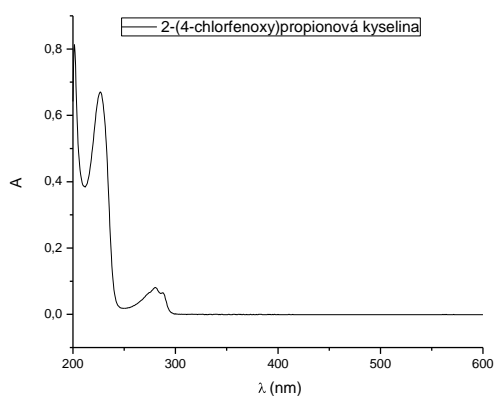
### 5.1 Spektrofotometrická analýza

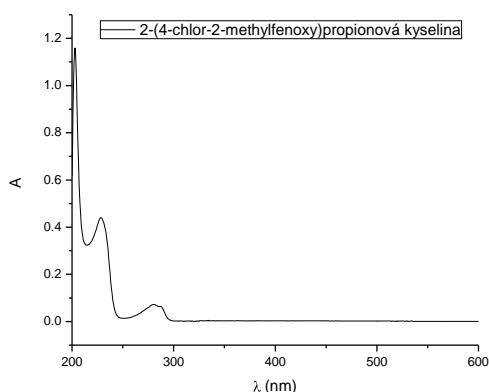
Připravené vzorky herbicidů MCPP, DCP, 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA pro spektrofotometrickou analýzu byly analyzovány na dvoupaprskovém skenovacím spektrofotometru SHIMADZU v rozsahu vlnových délek 200-600 nm – viz. Obr. 2.

Každý ze vzorků obsahoval 2 maxima absorbance při určitých vlnových délkách, kdy se pro herbicidní látky 1.maximum absorbance pohybovalo okolo 220 nm a 2.maximum absorbance okolo 280 nm – viz. Tab. 2. Vlnové délky byly zprůměrovány a použity pro detekci analyzovaných látek pomocí HPLC.

Tab. 2.: Vlnové délky poskytující dvě nejvyšší absorbance pro studované látky.

Vzorek	$\lambda_{1,\max}$ (nm)	$\lambda_{2,\max}$ (nm)
MCPP	226	280
DCPP	218	274
2-CPPA	217	274
3-CPPA	228	280
4-CPPA	230	284





Obr.2.: UV-VIS spektra vzorků chlorfenoxypropionových kyselin.

## 5.2 HPLC analýza

### 5.2.1 Analýza na koloně ZORBAX SB-C8

#### 5.2.1.1 Analýza v MF ACN/voda

První analýzy byly prováděny na koloně ZORBAX SB-C8 s MF ACN/voda v různých objemových poměrech. Na koloně byly analyzovány všechny vzorky herbicidních látek MCPP, DCP, 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA. Objemové poměry MF, při kterých se analýzy prováděly, byly ACN/voda 60/40 (v/v), 50/50 (v/v), 40/60 (v/v), 30/70 (v/v), 20/80 (v/v), 10/90 (v/v) a 5/95 (v/v). Získaná retenční data jsou uvedena v Tab. 3.

Retenční časy analyzovaných herbicidů u prvních analýz této MF s vysokým obsahem ACN se pohybovaly okolo mrtvého času kolony, proto tato fáze není pro dané analýzy vhodná. Se snižujícím se obsahem ACN v mobilní fázi docházelo k delším retenčním časům herbicidů a tudíž i lepšímu určení analyzovaných složek. Jednotlivé herbicidy od sebe nebylo možné oddělit s požadovaným rozlišením v důsledku blízkých retenčních časů. Píky navíc nebyly symetrické a některé byly nevyhodnotitelné – viz. Obr. 3. Kvůli vysoké polaritě a náboji analyzovaných látek se v dalších analýzách namísto vody použila kyselina mravenčí, pH 2,1.

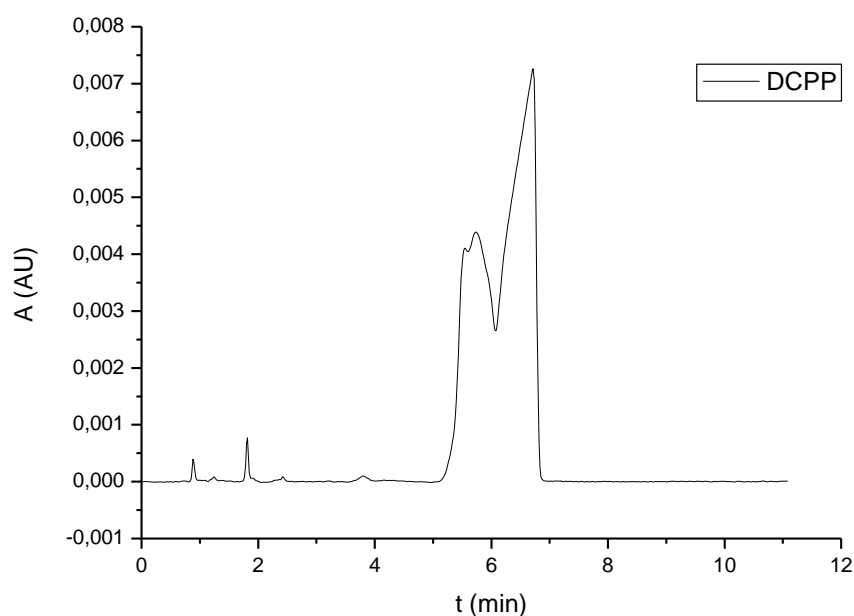
Tab. 3.: Výsledky analýzy chlorfenoxypropionových kyselin v MF ACN/voda o různých objemových poměrech, průtoku 1,0 ml/min a vlnové délce  $\lambda=278$  nm.  $t_R$  je retenční čas,  $k$  je retenční faktor.

Vzorek	ACN/voda							
	60/40 (v/v)		50/50 (v/v)		40/60 (v/v)		30/70 (v/v)	
	$t_R$ (min)	$k$	$t_R$ (min)	$k$	$t_R$ (min)	$k$	$t_R$ (min)	$k$
2-CPPA	1,31	0,88	1,33	0,98	1,91	1,89	2,03	2,06
4-CPPA	1,33	0,91	1,33	0,98	1,90	1,86	2,03	2,06
3-CPPA	1,31	0,89	1,33	0,98	1,93	1,89	2,04	2,07
DCPP	1,34	0,93	*	*	1,88	1,82	2,06	2,11
MCP	1,44	1,07	*	*	1,88	1,82	2,09	2,15

Vzorek	20/80 (v/v)		10/90 (v/v)		5/95 (v/v)	
	$t_R$ (min)	$k$	$t_R$ (min)	$k$	$t_R$ (min)	$k$
2-CPPA	2,20	2,22	2,98	3,34	4,54	5,58
4-CPPA	2,21	2,24	3,18	3,65	4,60	5,66
3-CPPA	2,20	2,23	3,13	3,57	4,62	5,70
DCPP	*	*	*	*	15,12	20,91
MCP	*	*	*	*	15,31	21,19

\* rozmyté píky, nevyhodnitelné



Obr. 3.: Příklad nevyhodnitelného chromatogramu. Chromatogram analýzy DCPP, kolona ZORBAX SB-C8, MF ACN/voda 10/90 (v/v), 1,0 ml/min,  $t=25^\circ\text{C}$  a  $\lambda=278$  nm.

### 5.2.1.2 Analýza v MF ACN/kyselina mravenčí

Následně byly použity MF ACN/kyselina mravenčí (o koncentraci 0,365 mol/l a pH 2,1) o různých objemových poměrech. Objemové poměry, při kterých se vzorky analyzovaly,



byly ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, 50/50 (v/v), 40/60 (v/v), 30/70 (v/v) a 20/80 (v/v). Získaná retenční data jsou uvedena v Tab. 4.

Při vysokém obsahu ACN v MF byly retenční časy látek stále krátké a jednotlivé herbicidy od sebe nebylo možné oddělit s požadovaným rozlišením, jelikož se na chromatogramu vzájemně překrývaly. Kvůli použití kyseliny mravenčí byly však píky už vyhodnotitelné bez významného rozmývání. Při analýzách v MF s nižším obsahem ACN měly MCPP a DCPD téměř totožné retenční časy, a proto je nebylo možné od sebe oddělit. Při nízkém obsahu ACN (20 obj.%) a vysokém obsahu kyseliny mravenčí (80 obj.%) byly retenční časy naopak příliš dlouhé a u MCPP a DCPD tyto retenční časy převyšovaly 120 min.

Tab. 4.: Výsledky analýzy chlorfenoxypropionových kyselin v MF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, o různých objemových poměrech, průtoku 1,0 ml/min a vlnové délce  $\lambda=278$  nm.

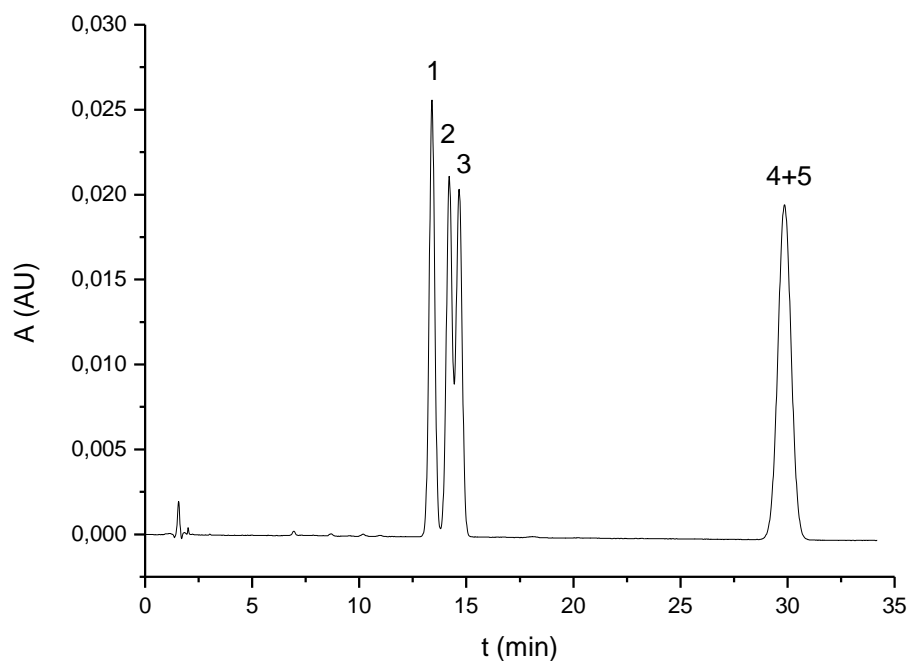
Vzorek	ACN/kyselina mravenčí							
	50/50 (v/v)		40/60 (v/v)		30/70 (v/v)		20/80 (v/v)	
	$t_R$ (min)	$k$	$t_R$ (min)	$k$	$t_R$ (min)	$k$	$t_R$ (min)	$k$
2-CPPA	3,61	1,24	5,98	2,57	13,39	6,86	43,61	23,68
4-CPPA	3,69	1,28	6,19	2,69	14,18	7,33	47,75	26,02
3-CPPA	3,75	1,32	6,34	2,78	14,66	7,61	49,70	27,13
DCPD	5,13	2,18	10,25	5,12	29,77	16,48	**	**
MCPD	5,14	2,18	10,26	5,12	29,92	16,57	**	**

\*\* retenční časy analytů jsou delší než 120 min

V MF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, v poměru 30/70 (v/v) byla separována směs pěti herbicidů MCPD, DCPD, 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA. Získaná data jsou uvedena v Tab. 5. Požadované rozlišení nebylo dosaženo mezi herbicidy 3-CPPA a 4-CPPA, které se překrývaly, avšak dosáhlo se částečného rozlišení ( $R = 0,81$ ) – viz. Obr. 4. MCPD a DCPD neměly ani náznak rozdělení, tudíž pro jejich další analýzu byla navržena MF obsahující namísto ACN MeOH, který má nižší eluční sílu v RP systémech.

Tab. 5.: Výsledky analýzy směsi pěti herbicidů MCPD, DCPD, 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA na koloně ZORBAX SB-C8 v MF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, 30/70 (v/v), 1,0 ml/min,  $t = 25^\circ\text{C}$  a  $\lambda=278$  nm. Herbicidy eluovaly z kolony v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA, 3./ 3-CPPA, 4./ DCPD a 5./ MCPD.  $k$  je retenční faktor,  $\alpha$  je selektivita,  $R$  je rozlišení.

Pík	$t_R$ (min)	$k$	$\alpha$	$R$
1	13,40	6,87	-	-
2	14,20	7,34	1,07	1,54
3	14,66	7,61	1,04	0,81
4 a 5	29,86	16,53	2,17	17,63

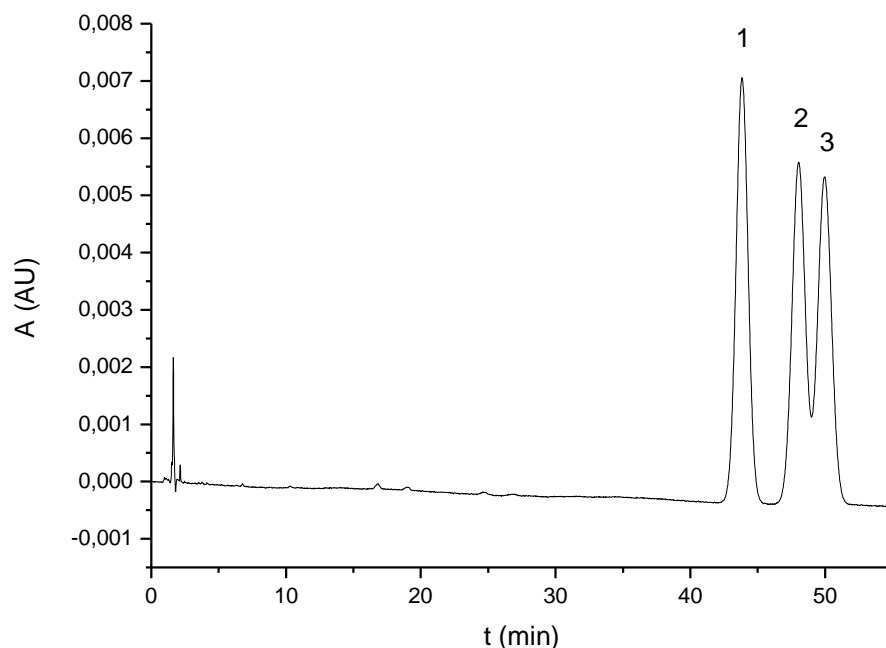


Obr. 4.: Chromatogram separace směsi herbicidů na koloně ZORBAX SB-C8 v MF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, 30/70 (v/v), 1,0 ml/min,  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda=278\text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA, 3./ 3-CPPA a 4.+5./ MCPP + DCP.

Následně byla směs tří herbicidů 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA analyzována v MF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, 20/80 (v/v). Získaná data jsou uvedena Tab. 6. Touto analýzou došlo k ještě lepšímu rozlišení mezi 2-CPPA a 3-CPPA s 4-CPPA. Avšak analyty 3-CPPA a 4-CPPA ještě stále nebyly odděleny až na základní linii – viz. Obr. 5.

Tab. 6.: Výsledky analýzy směsi tří herbicidů MCPP, DCP, 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA na koloně ZORBAX SB-C8 v MF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, 20/80 (v/v), 1,0 ml/min,  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda=278\text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly z kolony v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA a 3./ 3-CPPA.

Pík	$t_R\text{ (min)}$	$k$	$\alpha$	$R$
1	43,83	23,81	-	-
2	48,03	26,18	1,10	2,35
3	49,97	27,28	1,04	1,01

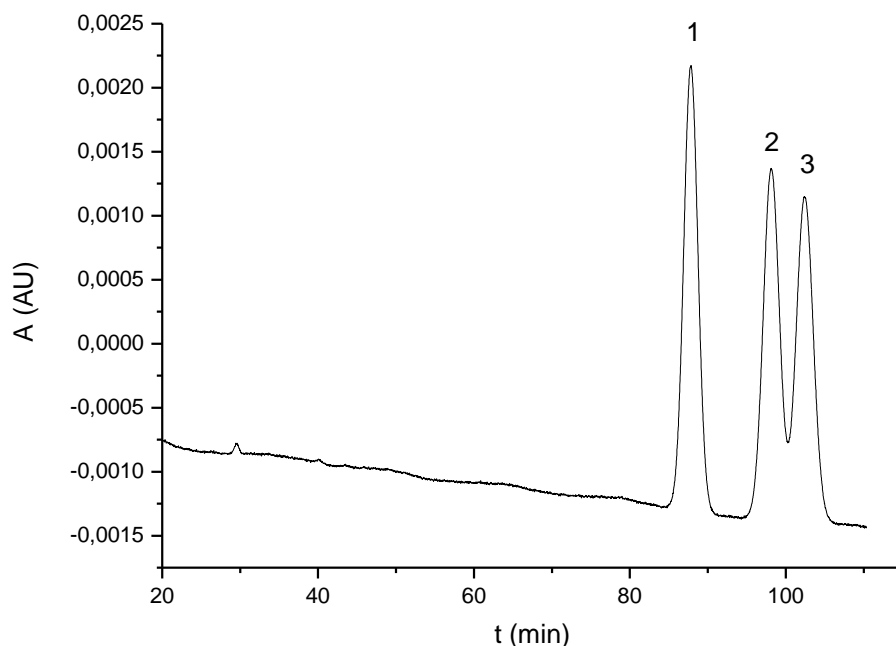


Obr. 5.: Chromatogram separace směsi herbicidů na koloně ZORBAX SB-C8 v MF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, 20/80 (v/v), 1,0 ml/min,  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda=278\text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA a 3./ 3-CPPA.

Směs tří herbicidů 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA byla dále analyzována v MF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, 15/85 (v/v). Získaná data jsou v Tab. 7. Při této analýze byly příliš dlouhé retenční časy analytů, a i přesto se od sebe 3-CPPA a 4-CPPA nepodařilo oddělit s požadovaným rozlišením – viz. Obr. 6.

Tab. 7.: Výsledky analýzy směsi tří herbicidů MCPP, DCP, 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA na koloně ZORBAX SB-C8 v MF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, 15/85 (v/v), 1,0 ml/min,  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda=278\text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly z kolony v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA a 3./ 3-CPPA.

Pík	$t_R$ (min)	$k$	$\alpha$	$R$
1	87,84	47,24	-	-
2	98,14	52,89	1,12	2,72
3	102,42	55,24	1,04	1,03



Obr. 6.: Chromatogram separace směsi herbicidů na koloně ZORBAX SB-C8 v MF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, 15/85 (v/v), 1,0 ml/min,  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda = 278 \text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA a 3./ 3-CPPA.

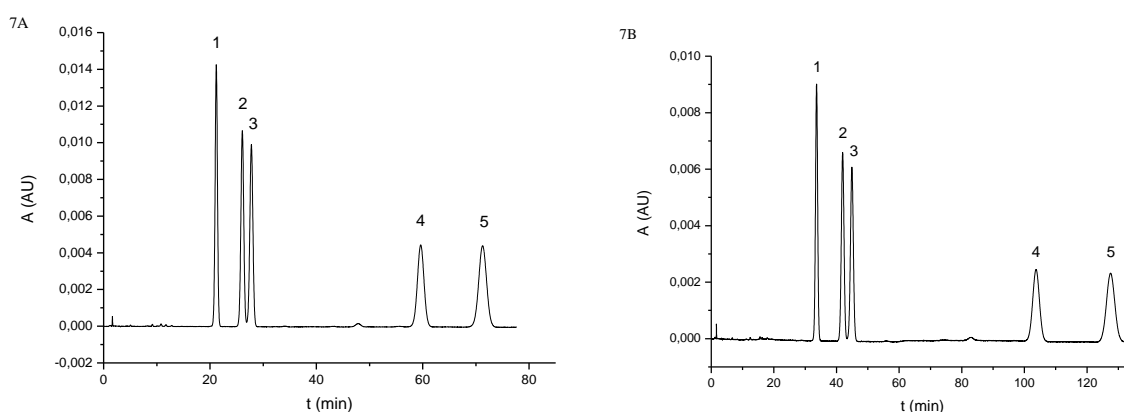
### 5.2.1.3 Analýza v MF MeOH/kyselina mravenčí

Po těchto analýzách byla ještě použita MF MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1. Nejprve se směs analyzovala při objemovém poměru MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1, 40/60 (v/v). Při použití této MF došlo k separaci všech analytů na základní linii – viz. Tab. 8. Analýza při tomto složení MF dosáhla nejkratších retenčních časů analyzovaných vzorků herbicidů a požadovaného rozlišení mezi všemi analyty – viz. Obr. 7A.

Směs pěti herbicidů byla analyzována také v MF MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1, v poměru 35/65 (v/v). Získaná data jsou uvedena v Tab. 8. Touto MF jsme se snažili zvýšit rozlišení mezi analyty 3-CPPA a 4-CPPA, které se z rozlišení  $R = 1,63$  zvýšilo na  $R = 1,77$ . Stejně tak, jako v případě MF 40/60 (v/v) měla i tato analýza požadované rozlišení, avšak s delší dobou analýzy – viz. Obr. 7B.

Tab. 8.: Výsledky analýzy směsi pěti herbicidů MCPP, DCPP, 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA na koloně ZORBAX SB-C8 v MF MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1, 40/60 (v/v) a 35/65 (v/v), 1,0 ml/min,  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda=278\text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly z kolony v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA, 3./ 3-CPPA, 4./ DCPP a 5./ MCPP.

Pík	MeOH/kyselina mravenčí							
	40/60 (v/v)				35/65 (v/v)			
	$t_R$ (min)	$K$	$\alpha$	$R$	$t_R$ (min)	$K$	$\alpha$	$R$
1	21,18	11,08	-	-	33,63	17,37	-	-
2	26,08	13,51	1,25	5,35	41,96	21,92	1,26	5,75
3	27,78	14,45	1,07	1,63	44,91	23,53	1,07	1,77
4	59,64	32,17	2,23	18,91	103,70	55,64	2,37	20,37
5	71,25	38,63	1,20	4,60	127,55	68,66	1,23	5,29



Obr. 7.: Chromatogramy separace směsi herbicidů na koloně ZORBAX SB-C8 v MF MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1, 40/60 (v/v) (A) a 35/65 (v/v) (B), 1,0 ml/min,  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda=278\text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA, 3./ 3-CPPA, 4./ DCPP a 5./ MCPP.

Pro snížení doby analýzy byla navíc použita metoda, kdy byl průtok MF navýšen na 1,5 ml/min. Objemový poměr mobilní fáze byl pro tuto analýzu 40/60 (v/v) MeOH/kyseliny mravenčí, pH 2,1. Získaná data jsou uvedena v Tab. 9.

Při vyšším průtoku MF však nebyly úplně na základní linii rozlišeny herbicidy 3-CPPA a 4-CPPA – viz. Obr. 8A.

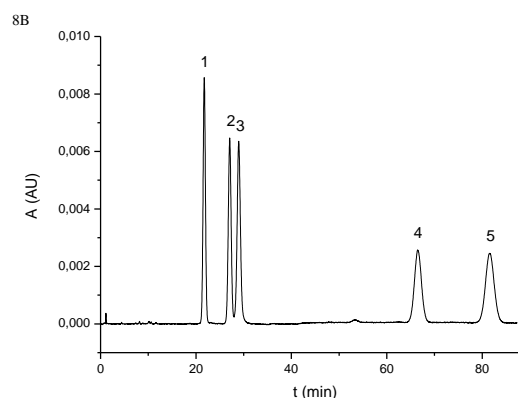
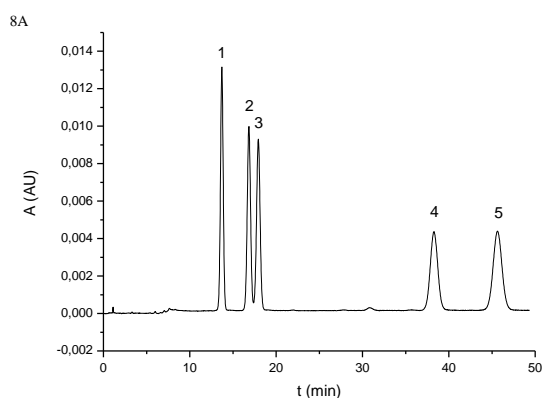
Směs pěti herbicidů byla poté analyzována také při zvýšeném průtoku na 1,5 ml/min v MF MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1, 35/65 (v/v). Získaná data jsou uvedena v Tab. 9.

Během této analýzy se oddělily všechny analyty až na základní linii, avšak retenční časy analytů byly delší, než při použití metody s průtokem 1 ml/min a MF MeOH/kyselina,

pH 2,1, 40/60 (v/v) – viz. Obr. 8B.

Tab. 9.: Výsledky analýzy směsi pěti herbicidů MCPP, DCP, 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA na koloně ZORBAX SB-C8 v MF MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1, 40/60 (v/v) a 35/65 (v/v), 1,5 ml/min,  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda=278\text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly z kolony v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA, 3./ 3-CPPA, 4./ DCP a 5./ MCPP.

Pík	MeOH/kyselina mravenčí							
	40/60 (v/v)				35/65 (v/v)			
	$t_R$ (min)	$k$	$\alpha$	$R$	$t_R$ (min)	$k$	$\alpha$	$R$
1	13,72	10,11	-	-	21,74	16,66	-	-
2	16,84	10,07	1,25	4,83	27,07	20,92	1,26	5,28
3	17,94	13,54	1,07	1,49	28,96	22,45	1,07	1,61
4	38,28	30,02	2,22	17,24	66,50	52,84	2,35	18,80
5	45,63	35,98	1,20	4,26	81,55	65,04	1,23	5,02



Obr. 8.: Chromatogramy separace směsi herbicidů na koloně ZORBAX SB-C8 v MF MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1, 40/60 (v/v) (A) a 35/65 (v/v) (B), 1,5 ml/min,  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda=278\text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA, 3./ 3-CPPA, 4./ DCP a 5./ MCPP.

## 5.2.2 Analýza na koloně ZORBAX Eclipse XDB-C18

### 5.2.2.1 Analýza v MF ACN/kyselina mravenčí

Kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18 byla vybrána kvůli nižší polaritě, než jakou měla kolona ZORBAX SB-C8. Tato kolona by měla poskytovat vyšší retenci než kolona se SF C8 při stejném složení MF. Jako první MF byla použita ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, o různých objemových poměrech. Na koloně byly analyzovány všechny vzorky jednotlivých herbicidů MCPP, DCP, 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA. Objemové poměry, při kterých se

analýzy prováděly, byly 50/50 (v/v), 40/60 (v/v), 30/70 (v/v) a 20/80 (v/v). Získaná retenční data jsou uvedena v Tab. 10.

SF C18 vykazovala při těchto MF vyšší retenční časy než SF C8. Herbicidy 3-CPPA a 4-CPPA zde byly opět jen částečně rozlišeny. MCPP a DCPP měly shodné retenční časy a nedaly se od sebe touto MF oddělit. Při nízkých objemech ACN (20 obj.%) a vysokých objemech kyseliny mravenčí (80 obj.%), pH 2,1 měly analyty MCPP a DCPP retenční časy větší než 120 min.

Tab. 10.: Výsledky analýzy chlorfenoxypropionových kyselin v MF ACN/kyselina mravenčí o různých objemových poměrech (v/v), průtoku 1,0 ml/min a vlnové délce  $\lambda=278$  nm.

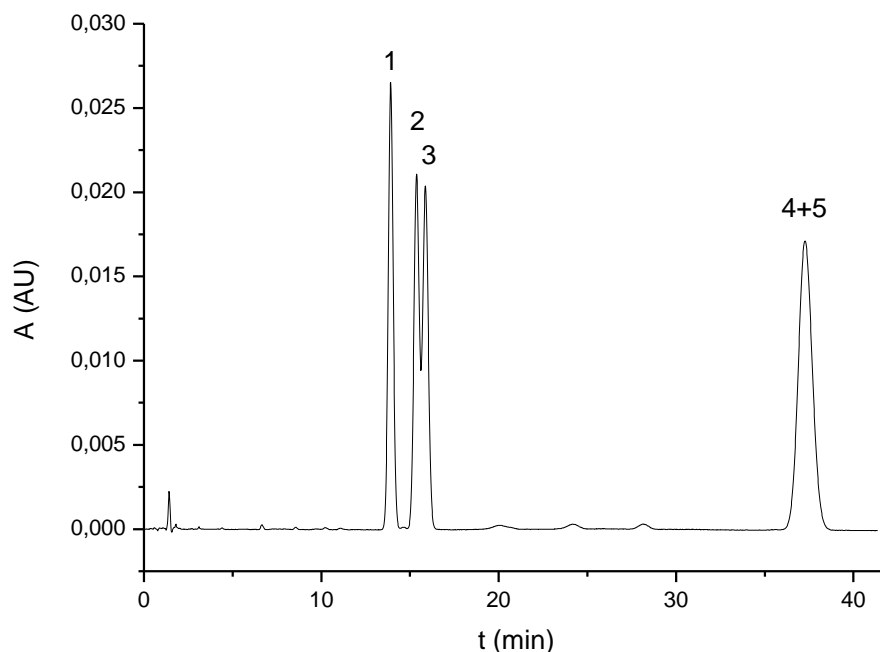
Vzorek	ACN/kyselina mravenčí							
	50/50 (v/v)		40/60 (v/v)		30/70 (v/v)		20/80 (v/v)	
	$t_R$ (min)	$k$	$t_R$ (min)	$k$	$t_R$ (min)	$k$	$t_R$ (min)	$k$
2-CPPA	3,44	1,34	5,91	2,97	14,00	8,14	50,59	30,96
4-CPPA	3,60	1,44	6,32	3,24	15,48	9,10	58,16	35,74
3-CPPA	3,67	1,49	6,48	3,35	15,98	9,43	60,60	37,28
DCPP	5,55	2,77	11,95	7,02	37,39	23,40	**	**
MCPP	5,54	2,76	11,86	6,96	37,13	23,24	**	**

\*\* retenční čas analytu byl delší než 120 min

Následně byla analyzována směs pěti herbicidů v MF 30/70 (v/v) ACN/kyselina, pH 2,1. Získaná data jsou uvedena v Tab. 11. Tato analýza poskytla výsledky, kdy mezi 3-CPPA a 4-CPPA není dosaženo požadovaného rozlišení až na základní linii. Herbicidy MCPP a DCPP od sebe nejsou ani náznakem rozděleny – viz. Obr. 9. Analýzou na této koloně se v těchto MF dosáhlo pouze delších retenčních časů.

Tab. 11.: Výsledky analýzy směsi pěti herbicidů MCPP, DCPP, 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA na koloně ZORBAX Eclipse XDB-C18 v MF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, 30/70 (v/v), 1,0 ml/min,  $t = 25^\circ\text{C}$  a  $\lambda=278$  nm. Herbicidy eluovaly z kolony v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA, 3./ 3-CPPA, 4./ DCPP a 5./ MCPP.

Pík	$t_R$ (min)	$k$	$\alpha$	$R$
1	13,91	8,08	-	-
2	15,37	9,03	1,12	2,57
3	15,87	9,36	1,04	0,79
4 a 5	37,27	23,33	2,49	20,13



*Obr. 9.: Chromatogram separace směsi herbicidů na koloně ZORBAX Eclipse XDB-C18 s MF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, 30/70 (v/v), 1,0 ml/min,  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda=278\text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA, 3./ 3-CPPA, 4.+5./ DCPP + MCPP.*

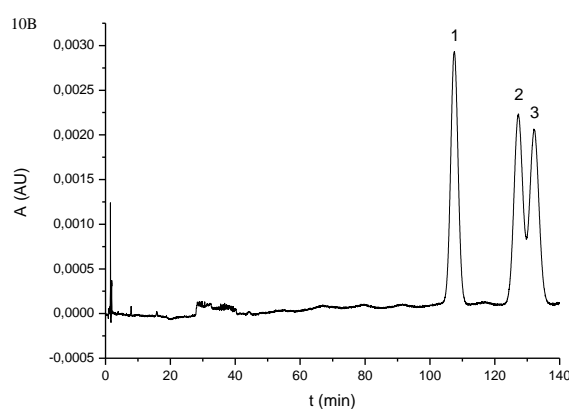
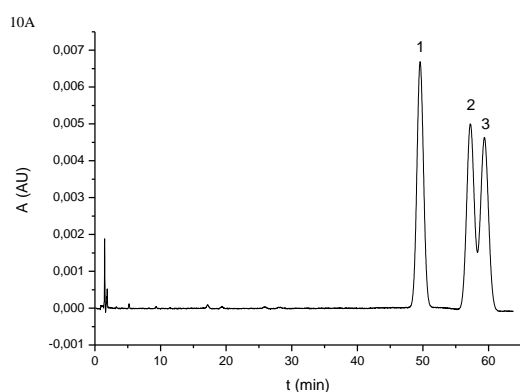
Další separace byly prováděny pouze pro směs tří herbicidů kvůli vysokým retenčním časům u analytů MCPP a DCPP. Směs tří herbicidů byla analyzována v MF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, při poměru 20/80 (v/v). Tato data jsou uvedena v Tab. 12. Stejně tak, jako v předchozím případě, na této koloně nedošlo k požadovanému rozlišení analytů 3-CPPA a 4-CPPA ( $R = 0,93$ ) – viz. Obr. 10A. Retenční časy byly delší než u kolony ZORBAX SB-C8.

Směs těchto tří herbicidů byla také analyzována v MF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, 15/85 (v/v). Získaná data jsou uvedena v Tab. 12. Ani při použití této MF nebylo dosaženo požadovaného rozlišení mezi vzorky 3-CPPA a 4-CPPA, které mají nyní ještě delší retenční časy, než jak tomu bylo při analýze na koloně ZORBAX SB-C8 – viz. Obr. 10B.



Tab. 12.: Výsledky analýzy směsi tří herbicidů 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA na koloně ZORBAX Eclipse XDB-C18 vMF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, 20/80 (v/v) a 15/85 (v/v), 1,0 ml/min,  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda=278\text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly z kolony v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA a 3./ 3-CPPA.

Pík	ACN/kyselina mravenčí							
	20/80 (v/v)				15/85 (v/v)			
	$t_R\text{ (min)}$	$k$	$\alpha$	$R$	$t_R\text{ (min)}$	$k$	$\alpha$	$R$
1	49,57	3,03	-	-	107,53	65,01	-	-
2	57,21	3,51	1,16	3,74	127,26	77,12	1,19	4,14
3	59,36	3,65	1,04	0,93	132,05	80,06	1,04	0,88



Obr. 10.: Chromatogramy separace směsi herbicidů na koloně ZORBAX Eclipse XDB-C18 v MF ACN/kyselina mravenčí, pH 2,1, 20/80 (v/v) (A) a 15/85 (v/v) (B), 1,0 ml/min.  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda=278\text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA a 3./ 3-CPPA.

#### 5.2.2.2 Analýza v MF MeOH/kyselina mravenčí

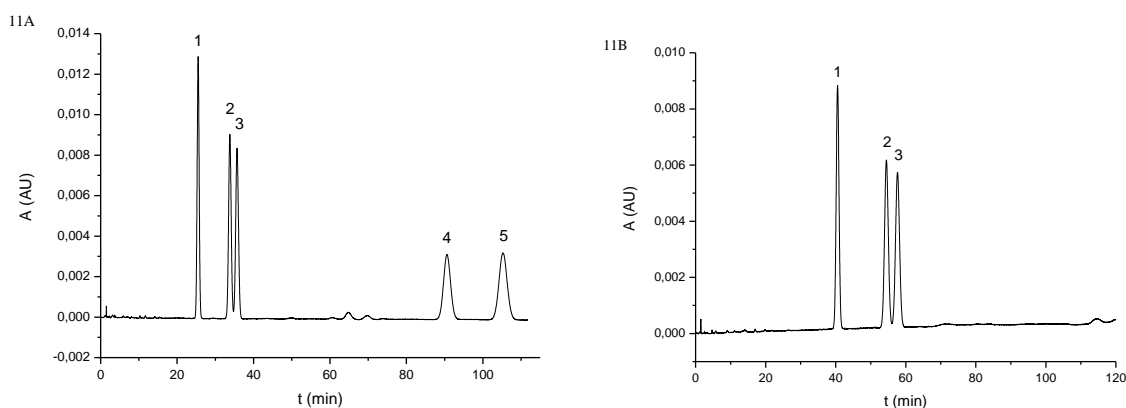
Následně byla ještě použita MF MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1. Směs pěti herbicidů byla analyzována v MF MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1, v poměru 40/60 (v/v). Získaná data jsou uvedena v Tab. 13. Herbicidy se při této MF od sebe oddělily, avšak mezi 3-CPPA a 4-CPPA nebylo dosaženo požadovaného rozlišení až na základní linii – viz. Obr. 11A. Analyty vykazovaly při použití stejných separačních podmínek delší retenční časy na SF C18, než jaké byly na SF C8.

Směs pěti herbicidů byla také analyzována v MF MeOH/kyselina, pH 2,1, 35/65 (v/v). Tato data jsou uvedena v Tab. 13. V této fázi bylo dosaženo rozlišení mezi analyty 3-CPPA a 4-CPPA  $R = 1,52$ . Herbicidy MCPP a DCPP však nezačaly do 120 min eluovat – viz. Obr. 11B. Tato metoda tudíž není vhodná pro oddělení všech pěti herbicidních látek od sebe v

přiměřeném čase analýzy.

Tab. 13.: Výsledky analýzy směsi pěti herbicidů MCPP, DCP, 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA na koloně ZORBAX Eclipse XDB-C18 v MF MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1, 40/60 (v/v) a 35/65 (v/v), 1,0 ml/min,  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda=278\text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly z kolony v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA, 3./ 3-CPPA, 4./ DCP a 5./ MCPP.

Pík	MeOH/kyselina mravenčí							
	40/60 (v/v)				35/65 (v/v)			
	$t_R\text{ (min)}$	$k$	$\alpha$	$R$	$t_R\text{ (min)}$	$k$	$\alpha$	$R$
1	25,50	14,87	-	-	40,53	24,08	-	-
2	33,80	20,04	1,35	7,34	54,47	32,71	1,36	7,87
3	35,69	21,21	1,06	1,41	57,64	34,67	1,06	1,52
4	90,62	55,39	2,61	22,93	**	-	-	-
5	105,28	64,51	1,17	3,96	**	-	-	-



Obr. 11.: Chromatogramy separace směsi herbicidů při koloně ZORBAX Eclipse XDB-C18 v MF MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1, 40/60 (v/v) (A) a 35/65 (v/v) (B), 1,0 ml/min,  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda=278\text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA, 3./ 3-CPPA, 4./ DCP a 5./ MCPP.

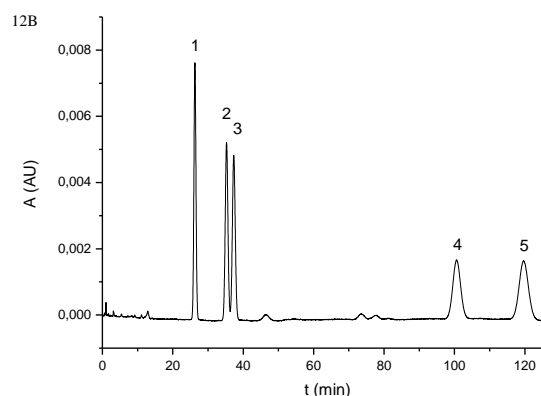
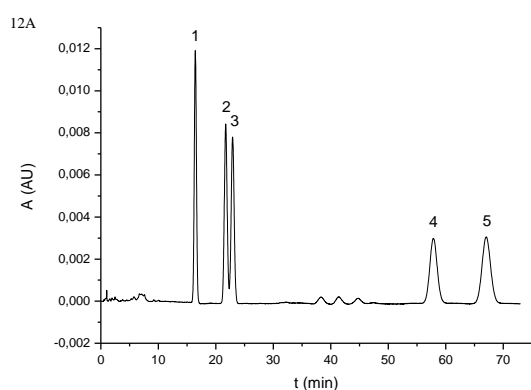
Pro snížení doby analýzy byla navíc použita metoda při zvýšeném průtoku MF, kdy se průtok MF zvýšil na 1,5 ml/min. MF byla pro tuto analýzu MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1, 40/60 (v/v). Získaná data jsou uvedena v Tab. 14. Touto analýzou došlo ke snížení retenčních časů analyzovaných látek, avšak u 3-CPPA a 4-CPPA nebylo dosaženo separace na základní linii, proto tato metoda není vhodná pro analýzu všech pěti herbicidů současně – viz. Obr. 12A.

Poté byla MF MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1, 35/65 (v/v) při průtoku 1,5 ml/min. Získaná data jsou uvedena v Tab. 14. Ani za těchto podmínek nebylo dosaženo požadovaného

rozlišení mezi analyty 3-CPPA a 4-CPPA – viz. Obr. 12B. Retenční časy jsou také delší při analýze na této koloně, než tomu tak bylo při stejné MF na koloně ZORBAX SB-C8.

Tab. 14.: Výsledky analýzy směsi pěti herbicidů MCPP, DCP, 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA na koloně ZORBAX Eclipse XDB-C18 v MF MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1, 40/60 (v/v) a 35/65 (v/v), 1,5 ml/min,  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda=278\text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly z kolony v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA, 3./ 3-CPPA, 4./ DCP a 5./ MCPP.

Pík	MeOH/kyselina mravenčí							
	40/60 (v/v)				35/65 (v/v)			
	$t_R$ (min)	$k$	$\alpha$	$R$	$t_R$ (min)	$k$	$\alpha$	$R$
1	16,44	13,91	-	-	26,28	22,59	-	-
2	21,72	18,71	1,35	6,54	35,28	30,66	1,14	7,09
3	22,92	19,80	1,06	1,28	37,32	32,50	1,06	1,37
4	57,83	51,48	2,60	20,89	100,56	89,27	2,75	22,47
5	67,04	59,84	1,16	3,60	119,59	106,35	1,19	4,26



Obr. 12.: Chromatogramy separace směsi herbicidů na koloně ZORBAX Eclipse XDB-C18 v MF MeOH/kyselina mravenčí, pH 2,1, 40/60 (v/v) (A) a 35/65 (v/v) (B), 1,5 ml/min,  $t = 25^{\circ}\text{C}$  a  $\lambda=278\text{ nm}$ . Herbicidy eluovaly v pořadí 1./ 2-CPPA, 2./ 4-CPPA, 3./ 3-CPPA, 4./ DCP a 5./ MCPP.

Kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18 se ukázala jako méně vhodná než kolona ZORBAX SB-C8 pro současnou separaci studovaných herbicidů za isokratických podmínek. Při použití kolony ZORBAX SB-C8 došlo k separaci všech pěti herbicidů na základní linii, což se nepodařilo na koloně ZORBAX Eclipse XDB-C18 do 120 minut.

## 6. Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na nalezení a optimalizaci chromatografických podmínek pro separaci pěti herbicidů MCPP, DCPP, 2-CPPA, 3-CPPA a 4-CPPA. Byl použit reverzní mód, kdy byla použita polární mobilní fáze a nepolární stacionární fáze.

Analýza s MF ACN/voda o různých objemových poměrech byla prováděna pouze na koloně ZORBAX SB-C8. Tyto mobilní fáze nebyly pro analýzy herbicidních látek vhodné. Při vysokých objemech ACN v mobilních fázích eluovaly analyty z kolony v době mrtvého času kolony. Při nízkých objemech ACN byly retenční časy analytů delší, avšak některé píky nebyly dobře vyhodnotitelné.

Analýza s MF ACN/kyselina mravenčí (o koncentraci 0,365 mol/l a pH 2,1) byla prováděna na koloně ZORBAX SB-C8 a koloně ZORBAX Eclipse XDB-C18. MCPP a DCPP eluovaly v téměř stejném čase, takže se je nepodařilo oddělit ani na jedné z testovaných kolon. 3-CPPA a 4-CPPA byly separovány pouze částečně při použití MF s ACN na obou kolonách.

Analýza s MF MeOH/kyselina mravenčí (o koncentraci 0,365 mol/l a pH 2,1) byla prováděna na koloně ZORBAX SB-C8 i koloně ZORBAX Eclipse XDB-C18. Kolona ZORBAX SB-C8 vykazovala v těchto MF vyšší hodnoty rozlišení a nižší retenční časy než kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18.

Nejvhodnější separační podmínky byly získány na koloně ZORBAX SB-C8 v MF MeOH/kyselina mravenčí (o koncentraci 0,365 mol/l a pH 2,1) 40/60 (v/v), průtoku 1,0 ml/min, teplotě 25°C a vlnové délce  $\lambda=278$  nm. Za těchto podmínek došlo k separaci všech pěti analytů na základní linii za 80 min.

## 7. Seznam použité literatury

- 1 Nováková, L.; Douša, M.; Blatný, P.; Jandera, P.; Planeta, J.; Maier, V.; Znaležiona, J.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha, Europrint a.s. 2013.
- 2 Pacáková, V.; Štulík, K.: *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*. Praha, Státní pedagogické nakladatelství 1986.
- 3 Popl, M.; Kubát, J.: *Základy chromatografie*. SNTL, 1981.
- 4 Štulík, K.; Bosáková, Z.; Coufal, P.; Jelínek, I.; Pacáková, V.; Ševčík, K.: *Analytické separační metody*. Praha, Karolinum 2004.
- 5 Boček, P.; Deyl, Z.; Horna, A.; Churáček, J.; Janák, J.; Janče, J.; Jandera, P.; Kalvoda, R.; Komárek, K.; Kopanica, M.; Krejčí, M.; Novák, J.; Vytřas, K.: *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Academia Praha, 1993.
- 6 Poole, C. F.: *The Essence of Chromatography*. Elsevier Science B. V. 2003.
- 7 Večeřa, Z.: *Pesticidy: Výroba, vlastnosti a použití*. SNTL, Praha, 1964.
- 8 Horák, J.; Rod, J.: *Účinná ochrana zahradních rostlin*. Grada, 2011.
- 9 Vanc, P.: *Zahrada bez plevelu*. Grada, 2001.
- 10 Rügge, K.; Juhlerb, R. K.; Broholma, M. M.; Bjerg, P. L.: *Water Research* **36**, 4160-4164 (2002).
- 11 Obenberger, J.; Trojan, V.: *Průručka chemické ochrany rostlin*. SNTL, Praha, 1976.
- 12 Rataj, K.: *Chemické hubení plevelů ve lnu*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1956.
- 13 Zbirovský, M.; Myška, J.; Zemánek, J.: *Herbicide: Chemické prostředky proti plevelům*. Nakladatelství československé akademie věd, Praha, 1960.
- 14 Rataj, K.; Dias, R.; Janyška, A.: *Chemické ničení plevelů*. Mír, Praha, 1965.
- 15 Rataj, K.; Zapletalová, A.; Vašák, V.; Müller, Z.: *Pokrokové metody boje s plevely*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1957.
- 16 Kocek, V.: *Metody regulace pýru plazivého Elytrigia repens (L.) Desv. na orné půdě*. České Budějovice, 2012. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích. Zemědělská fakulta.
- 17 Janásová, N.: *Příprava a testování mikročástic pro postupné uvolňování agrochemikálií*. Zlín, 2015. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.
- 18 Jursík, M.; Soukup, J.; Holec, J.; Andr, J.: *Listy cukrovarnické a řepařské*, 127 (2001).
- 19 Rimmer, D. A.; Johnson, P. D.; Brown, R. H.: *Journal of Chromatography A* **755**, 245-250 (1996).

- 
- 20 Zhang, Q. X.; Gil, V.; Sanchez-Lopez, E.; Garcia, M. A.; Jiang, Z. J.; Marina, M. L.: *Microchemical Journal* **123**, 15-21 (2015).
- 21 Buser, H. R.; Müller, M. D.: *Environmental Science and Technology* **31**, 1953-1959 (1997).
- 22 Agromanual<sup>®</sup>.cz. *Agromanual.cz*. [online]. 2016 [cit. 2016-07-06]. Dostupné z: <http://www.agromanual.cz/cz/pripravky/herbicity>.
- 23 Rosales-Conrado, N.; Leon-Gonzalez, M. E.; D'Orazio, G.; Fanali, S.: *Journal of Separation Science* **27**, 1303-1308 (2004).
- 24 Caballo, C.; Sicilia, M. D.; Rubio, S.: *Analytica Chimica Acta* **761**, 102-108 (2013).
- 25 Rosales-Conrado, N.; Guillen-Casla, V.; Vicente Perez-Arribas, L.: *Food Analytical Methods* **6**, 535-547 (2013).
- 26 Tsipi, D.; Hiskia, A.; Heberer, T.; Stan, H. J.: *Water and Soil Pollution* **104**, 259-268 (1998).
- 27 Maier, M. P.; Qiu, S. R.; Elsner, M.: *Analytical and Biochemical Chemistry* **405**, 2825-2831 (2013).
- 28 Frková, Z.; Johansen, A.; Karlson, U. G.: *Soil Biology and Biochemistry* **84**, 189-198 (2015).
- 29 Benfeito, S.; Silva, T.; Garrido, J.; Andrade, P. B.; Sottomayor, M. J.; Borges, F.; Garrido, E. M.: *BioMed Research International* **2014** (2014).
- 30 Miura, M.; Terashita, Y.; Funazo, K.; Tanaka, M.: *Journal of Chromatography A* **846**, 359-367 (1999).
- 31 Liu, J. F.; Torang, L.; Mayer, P.; Jonsson, J. A.: *Journal of Chromatography A* **1160**, 56-63 (2007).
- 32 Romero, E.; Dios, G.; Mingorance, M. D.; Matallo, M. B.; Pena, A.; Sánchez-Rasero, F.: *Chemosphere* **37**, 577-589 (1998).
- 33 Thorstensen, C. W.; Lode, O.; Christiansen, A. L.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 5829-5833 (2000).
- 34 Raepfel, C.; Nief, M.; Fabritius, M.; Racault, L.; Appenzeller, B. M.; Millet, M.: *Journal of Chromatography A* **1218**, 8123-8129 (2011).
- 35 Saito, K.; Yato, M.; Ito, T.; Iwasaki, Y.; Ito, R.; Matsuki, Y.; Nakazawa, H.: *Accreditation and Quality Assurance* **13**, 373-379 (2008).
- 36 Zipper, C.; Bolliger, C.; Fleischman, T.; Suter, M. J. F.; Angst, W.; Muller, M. D.; Kohler, H. P. E.: *Biodegradation* **10**, 271-278 (1999).
- 37 Rugge, K.; Juhler, R. K.; Broholm, M. M.; Bjerg, P. L.: *Water Research* **36**, 4160-4164

---

(2002).

- 38 Sanchez-Rasero, F.; Matallo, M. B.; Dios, G.; Romero, E.; Pena, A.: *Journal of Chromatography A* **799**, 355-360 (1998).
- 39 Caballo, C.; Sicilia, M. D.; Rubio, S.: *Talanta* **119**, 46-52 (2014).
- 40 Levi, S.; Hybel, A.-M.; Bjerg, P. L.; Albrechtsen, H.-J.: *Science of The Total Enviroment* **473-474**, 667-675 (2014).
- 41 Yuzir, A.; Chelliapan, S.; Sallis, P. J.: *Bioresource Technology* **112**, 9456-9561 (2011).
- 42 Khan, M. A.; Choi, Ch.-L.; Lee, D.-H.; Park, M.; Lim, B.-K.; Lee, J.-Y.; Choi, J.: *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **68**, 1591-1597 (2007).
- 43 EPA MCPP-p Team: *Reregistration Eligibility Decision (RED) for Mecoprop-p (mcpp)*. Environmental protection agency, United states (2007).
- 44 Rodríguez-Cruz, M. S.; Bæleum, J.; Shaw, L. J.; Sørensen, S. R.; Shi, S.; Aspray, T.; Jacobsen, C. S.; Bending, G. D.: *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 32-39 (2010).
- 45 Meunier, L.; Boule, P.: *Pest Management Science* **56**, 1077-1085 (2000).
- 46 Tunç, S.; Duman, O.; Soylu, I.; Bozoğlan, B. K.: *Journal of Hazardous Material* **273**, 36-43 (2014).
- 47 EPA 2,4-DP-p Team: *Reregistration Eligibility Decision (RED) for Dichlorprop-p (2,4-DP-p)*. Environmental protection agency, United states (2007).
- 48 Meunier, L.; Gauvin, E.; Boule, P.: *Pest Management Science* **58**, 845-852 (2002).